



REC'D 27 OCT 2003

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JUIL. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

**BEST AVAILABLE COPY**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*01

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 300301

Réservé à l'INPI

**REMISE DES PIÈCES**

DATE **1 AOUT 2002**  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0209836**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI  
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI **- 1 AOUT 2002**

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
**À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET BEAU DE LOMENIE**  
**158, rue de l'Université**  
**75340 PARIS CEDEX 07**

**Vos références pour ce dossier**  
(facultatif)

**H189130/20.MLG**

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*  
*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

N°

Date

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

**"Méthode de détermination d'une activité enzymatique endoglycosidase"**

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**  
**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE**  
**LA DATE DE DÉPÔT D'UNE**  
**DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

**5 DEMANDEUR**

☐ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

**CIS BIO INTERNATIONAL**

Prénoms

Forme juridique

**Société Anonyme**

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

**RN 306**

Code postal et ville

**91400 SACLAY**

Pays

**FRANCE**

Nationalité

**Française**

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES	
DATE	1 AOUT 2002
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0209836
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 300301

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		H189130/20.MLG
<b>6 MANDATAIRE</b>		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		CABINET BEAU DE LOMENIE
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	158, rue de l'Université
	Code postal et ville	75 004 PARIS CEDEX 07
N° de téléphone (facultatif)		01.44.18.89.00
N° de télécopie (facultatif)		01.44.18.04.23
Adresse électronique (facultatif)		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
Marie-Louise GILLARD CPI N° 92.1099		L. MARIELLO

### Domaine et état de la technique

La présente invention concerne une méthode de détermination d'une activité enzymatique endoglycosidase, et en particulier de type héparanase dans un échantillon ainsi qu'une méthode de détection d'un composé susceptible de moduler l'activité d'une endoglycosidase, et en particulier ayant une activité de type héparanase.

Les endoglycosidases sont des enzymes capables de catalyser des réactions de clivage à l'intérieur de chaînes glycosidiques.

10 L'héparanase est une enzyme capable de cliver des polymères comprenant des unités glycosaminoglycanes, tels que par exemple, les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (HSGAG).

Un processus majeur de l'invasion des tissus par les cellules cancéreuses de tumeurs des lignées sanguines implique leur passage à travers l'endothélium des vaisseaux sanguins, puis la dégradation de la lame basale sous-jacente et de la matrice extra-cellulaire par un ensemble de protéases et de glycosidases.

La lame basale et le tissu conjonctif sous-jacent sont composés d'un réseau complexe de fibronectine, laminine, collagène de type IV et de vitronectine, chacune interagissant avec les chaînes latérales héparane sulfates (HS) des protéoglycanes enchâssés dans la matrice extra-cellulaire.

Le clivage des HS par des endoglycosidases, par exemple des enzymes ayant une activité de type héparanase, produites par les cellules invasives peut par conséquent contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire et de la lame basale et ainsi faciliter la migration cellulaire.

25 Il a été montré que l'activité héparanasique a un lien avec le potentiel métastatique des lignées cellulaires de mélanomes murin et humain. En particulier, le potentiel métastatique de lignée cellulaire de fibrosarcomes et de mélanomes humain et murin est en relation avec l'activité héparanase produite par ces lignées. Par ailleurs, l'activité héparanase a été décrite dans plusieurs types tissulaires et cellulaires, notamment le foie de rat, le placenta humain, les plaquettes humaines, des fibroblastes en culture, les neutrophiles humains, les lymphocytes-T activés de rat, les lymphocytes B murins, les monocytes humains et dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.

Les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) sont composés d'une partie protéique enchâssée dans les membranes cellulaires, substituées par des chaînes d'HS. Ces chaînes sont généralement constituées d'unités disaccharidiques sulfatées (de manière prédominante de glucosamine N-sulfatée liée à un résidu d'acide alpha-L-iduronique), séparées par des régions peu ou non-sulfatées (de manière prédominante des unités disaccharidiques de glucosamine N-acétylée liée à une unité d'acide beta-D-glucuronique). Les HS peuvent présenter une grande variété, en raison du nombre variable d'unités disaccharidiques et de leur séquence qui peut différer d'une chaîne à l'autre.

Dans la mesure où le clivage des HS semble être essentiel à la migration de cellules métastatiques à travers les membranes basales, les inhibiteurs de l'activité héparanase constituent une nouvelle classe de composés potentiellement utiles en tant que médicaments anti-métastatiques ou anti-inflammatoires.

Plusieurs groupes ont mis au point des dosages de l'activité héparanase, notamment dans le but d'isoler de nouveaux composés qui pourraient être utilisés comme médicaments.

La plupart des méthodes développées pour doser une activité héparanase sont basées sur le radiomarquage d'un substrat de l'héparanase, et l'analyse des fragments générés après incubation avec un échantillon contenant cette enzyme.

La demande WO 00/77241 rapporte dans sa partie introductive que des atomes ou groupements radioactifs ( $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ) peuvent être incorporés par des HSGAG en cultivant des cellules en présence de ces radioéléments. Le HSGAG radiomarké est ensuite utilisé comme substrat. Il est également possible de marquer le HSGAG par  $^3\text{H}$  ou  $^{125}\text{I}$ . L'activité héparanase est déterminée en mesurant une diminution de la radioactivité ou une réduction du poids moléculaire des molécules marquées. Dans ce dernier cas, le substrat est analysé par électrophorèse ou par chromatographie.

Ces techniques présentent les inconvénients habituels liés à l'utilisation de radioéléments, notamment en terme de radioprotection, elles sont qualitatives, ne permettent que difficilement de quantifier l'activité enzymatique mesurée et ne sont pas adaptées au criblage à haut débit.

La demande WO 00/77241 divulgue une méthode de dosage de l'activité héparanase basée sur la détection de fragments d'HSGAG clivés par l'enzyme présente dans l'échantillon à tester. Le substrat HSGAG est lié d'une part à un

support solide à l'aide d'un motif de liaison et d'autre part à un régulateur cellulaire capable de se lier au HSGAG (par exemple un facteur de croissance). Après mise en contact avec l'échantillon à tester, les fragments clivés sont immobilisés par une liaison spécifique avec un deuxième support solide. Les fragments ainsi séparés  
5 peuvent être détectés par exemple en utilisant un anticorps marqué spécifique du groupe de liaison ou du facteur de croissance, par des techniques de colorimétrie ou de fluorescence. Le signal mesuré est représentatif de l'activité héparanase dans l'échantillon et reflète directement l'activité biologique de génération de complexes  
10 facteur de croissance HSGAG produits dans des états physiologiques ou pathologiques. L'inconvénient de cette technique réside dans l'utilisation d'un support solide qui peut entraîner des problèmes d'adsorption non-spécifique, qui augmente la lourdeur et les coûts du dosage, ainsi que dans l'étape de séparation qui peut être fastidieuse dans des processus de criblage à haut débit.

La demande WO 00/03306 décrit un dosage d'activités glycosidases, et en  
15 particulier une méthode de criblage d'agents anti-cancéreux ou anti-inflammatoires. La méthode est basée sur l'étude de l'effet d'un agent à tester sur l'activité héparanase en présence d'un substrat de type HS. L'activité héparanase est déterminée en séparant les fragments de substrat clivé par chromatographie sur  
20 colonne ou par électrophorèse, par un dosage colorimétrique, en particulier un dosage colorimétrique permettant de détecter les sucres réducteurs formés lors du clivage du substrat.

Dans cette demande, le substrat est couplé à des billes de Sépharose® et une étape de centrifugation est nécessaire pour séparer les fragments clivés solubles et les identifier par une méthode colorimétrique (Carbazole ou bleu de  
25 diméthylméthylène).

Le brevet US 6,207,402 décrit une méthode de détection d'une activité enzymatique héparanase comportant des étapes de séparation et de détection des produits de dégradation d'un substrat de cette enzyme.

Des dosages d'enzymes hydrolytiques basés sur la détection de  
30 fluorescence émise par transfert d'énergie ont été décrits (caspase 3, protéase du virus Herpes simplex, protéase du VIH) mais dans tous les cas le substrat était un substrat protéique ou peptidique. De tels substrats sont aisément fonctionnalisables, ce qui n'est pas le cas des substrats des endoglycosidases telles que l'héparanase ou l'héparitinase. Cela est notamment dû au fait que les HS sont produits par un

ensemble de processus biochimiques complexes et sont donc difficiles à fabriquer par synthèse chimique, ainsi qu'à la très grande diversité des héparanes sulfates.

La chimie combinatoire a donné naissance à des banques de composés constituées de plusieurs centaines de milliers de produits. Afin de tester l'intérêt de ces molécules dans un délai et à un coût raisonnables, il est nécessaire d'utiliser des modèles simples, rapides, fiables, et pouvant être facilement automatisés. Les techniques précédemment développées pour doser l'activité héparanase sont peu adaptées à une telle utilisation, en particulier dans le cadre du criblage à haut débit de banques de molécules

Le problème technique à résoudre consiste donc à développer une technique répondant à ces critères, en particulier un dosage de l'activité héparanase adapté à une utilisation intensive, miniaturisable et sensible. La présente invention fournit un tel dosage.

#### **DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION :**

La présente invention a pour objet le dosage d'une activité endoglycosidase basé sur la mesure d'un signal résultant d'un transfert de proximité entre deux composés fixé sur le substrat de l'enzyme, et ne nécessitant donc aucune étape de séparation des fragments issus de l'activité de l'enzyme.

Le transfert de proximité peut être un transfert d'énergie (phénomène de FRET, technologie HTRF®, CIS bio international), un transfert de photon, un transfert d'oxygène singulet (technologie Alphascreen®, PerkinElmer, voir par exemple Beaduet et al., Genome Res., 2001 Apr. 11 (4), 600-8), un transfert d'électron (technologie SPA, Amersham Biosciences, voir par exemple Udenfriend et al., Anal. Biochem., 1987, Mar., 161(2), 494-500).

L'invention concerne en particulier un dosage d'une activité endoglycosidase basé sur une mesure de fluorescence en milieu homogène et en temps résolu, résultant d'un transfert d'énergie entre un composé fluorescent donneur et un composé fluorescent accepteur fixés sur le substrat. De manière préférée cette endoglycosidase a une activité de type héparanase.

Le phénomène de FRET (Fluorescence resonance energy transfer), permet une mesure de fluorescence en temps résolu et en milieu homogène. La mise en œuvre de cette technique avec des chélates ou des cryptates de terres rares,

développée notamment par G. Mathis et al. (voir notamment « Homogeneous time resolved fluorescence energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology », *Spectrochimica Acta Part A* 57 (2001) 2197-2211 ) présente de nombreux avantages qui ont déjà permis plusieurs applications dans le domaine du diagnostic in vitro et dans celui du criblage à haut débit dans l'industrie pharmaceutique.

Cette technique également connue sous le nom de HTRF® (Homogenous Time Resolved Fluorescence) met en œuvre un premier composé fluorescent donneur et un second composé fluorescent accepteur. Dans la méthode selon l'invention, ces composés sont couplés de manière directe ou indirecte à un substrat d'une enzyme ayant une activité endoglycosidase, en particulier une activité de type héparanase.

Après excitation lumineuse du milieu contenant le substrat, un transfert d'énergie a lieu entre le composé donneur et le composé accepteur, résultant en une émission de lumière par le composé accepteur qui peut être mesurée à l'aide d'un fluorimètre. En présence d'une enzyme ayant une activité endoglycosidase, en particulier une activité de type héparanase, le substrat est clivé et du fait de l'éloignement des composés donneur et accepteur, le transfert d'énergie n'aura plus lieu, ce qui se traduira par une diminution du signal émis par le composé accepteur.

En présence d'un composé inhibiteur ou activateur de l'activité endoglycosidase, en particulier une activité de type héparanase, le signal mesuré sera modifié par rapport au signal mesuré en l'absence d'inhibiteur ou d'activateur.

Plusieurs obstacles techniques ont dû être pris en considération pour développer les procédés selon l'invention.

La distance entre le premier et le deuxième composé fluorescent constitue un aspect critique dans un dosage utilisant le phénomène de FRET. En particulier, le transfert d'énergie est inversement proportionnel à la distance entre le donneur et l'accepteur à la puissance 6. Cet aspect doit être pris en compte pour marquer le substrat utilisé dans le dosage selon l'invention : la distance séparant le premier et le deuxième composé fluorescent doit permettre à la fois que le transfert d'énergie ait lieu et que le clivage du substrat entraîne effectivement un éloignement des deux composés fluorescents.

Par conséquent, les quantités de chacun des composés fluorescents donneur et accepteur doivent être optimisées : si le substrat comporte un trop grand



nombre de composés fluorescents, le signal observé ne variera pas de manière significative lors du clivage par une enzyme ayant une activité endoglycosidase, en particulier une activité de type héparanase. Dans le cas contraire, si trop peu de composés fluorescents sont utilisés, le transfert d'énergie n'aura pas lieu ce qui se traduira par une absence de signal. Les inventeurs ont ainsi optimisé les proportions de composés fluorescents donneur et accepteur à utiliser pour fonctionnaliser le substrat. Ces proportions correspondent au rapport molaire initial ( $R_{mi}$ ) et au rapport molaire final ( $R_{mf}$ ) pour chaque fluorophore. Le  $R_{mi}$  correspond à la proportion de fluorophore par rapport au substrat lors de la réaction de marquage. Si le fluorophore est couplé de manière indirecte au substrat, par l'intermédiaire d'un couple ligand/récepteur, le  $R_{mi}$  correspondra à la proportion de ligand sur la quantité de substrat. Le  $R_{mf}$  se calcule de la même façon mais après la réaction de marquage : il correspond donc au nombre de molécules de fluorophore ou de ligand fixées sur le substrat.

D'autres paramètres ont dû être pris en considération lors de la fabrication du substrat utilisable dans les procédés selon l'invention.

Le pH du milieu réactionnel joue un rôle important lors de la réaction de marquage, en particulier si les groupements amine ou carboxyles de l'héparansulfate sont utilisés lors du couplage du composé fluorescent donneur, du composé fluorescent accepteur, ou d'un membre d'un couple ligand/récepteur. En effet, le pH détermine la réactivité des fonctions amines ou carboxyles utilisées lors de la fonctionnalisation du substrat. Les inventeurs ont ainsi déterminé que le pH optimal pour la fabrication d'un substrat utilisable dans les méthodes selon l'invention se situe dans une plage de 7,5 à 9 et est de préférence égal à 8,3 lorsque les amines libres de l'HS sont utilisées, et dans une plage de 5 à 7, de préférence égal à 6 lorsque des fonctions carboxyles libres sont utilisées.

Pour développer un dosage d'activité endoglycosidase, et en particulier une activité enzymatique de type héparanase, basé sur le phénomène de FRET, les inventeurs ont dû surmonter un certain nombre de difficultés techniques spécifiques du dosage de ces enzymes, qui n'apparaissent pas dans les dosages de substrats protéiques ou d'autres activités enzymatiques :

1/ Dans les dosages d'activités enzymatiques basés sur la technique de FRET de l'art antérieur, les sites de clivage enzymatiques sont clairement caractérisés alors que des incertitudes demeurent en ce qui concerne les HS : il est

par conséquent très difficile de fonctionnaliser le substrat de part et d'autre d'un site de coupure.

2/ Les HS présentent une très grande hétérogénéité aussi bien en ce qui concerne la séquence des unités glycosidiques que la longueur des chaînes : une fonctionnalisation chimiquement localisée et donc difficile à obtenir puisque la structure des HS varie d'une molécule à l'autre.

3/ Les interactions protéine-HS sont beaucoup moins stables que les interactions protéines-protéines : la fixation directe ou indirecte des composés donneur et accepteurs peut perturber d'autant plus facilement l'interaction endoglycosidase / HS.

L'invention concerne en premier lieu une méthode de détermination d'une activité enzymatique endoglycosidase dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- i. mettre en contact un substrat susceptible d'être clivé par une endoglycosidase avec ledit échantillon, et
- ii. mesurer l'évolution de la quantité de substrat intact, une diminution de quantité de ce substrat étant représentative d'une activité endoglycosidase dans l'échantillon.

Dans cette méthode, le substrat est marqué de manière directe ou indirecte par un premier composé donneur et par un second composé accepteur, et la quantité de substrat intact est déterminée en mesurant un signal émis par le composé accepteur, ce signal résultant d'un transfert par effet de proximité entre le donneur et l'accepteur.

Cette méthode peut être utilisée pour mesurer des endoglycosidases capables de cliver des héparanes sulfates comme par exemple l'héparanase ou l'héparitinase.

Dans une mise en œuvre particulière de cette méthode, le premier composé donneur et le second composé accepteur sont des composés fluorescents, le transfert de proximité est un transfert d'énergie et le signal émis est un signal fluorescent.

Par « marquage de manière directe », on entend la liaison du marqueur fluorescent sur un groupe fonctionnel présent ou préalablement introduit ou généré sur le substrat. Un bras d'espacement peut être introduit entre le marqueur fluorescent et le substrat.

Par « marquage de manière indirecte », on entend la liaison du marqueur fluorescent au substrat par l'intermédiaire d'un couple ligand-récepteur. Dans ce cas, le marqueur fluorescent et le substrat sont chacun marqués par un membre d'un couple ligand-récepteur.

5           Le composé fluorescent donneur est un composé fluorescent qui après excitation à une longueur d'onde déterminée va émettre un signal fluorescent qui, en opérant un transfert d'énergie, va exciter le composé fluorescent accepteur. De nombreux composés fluorescents donneurs peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. A titre d'exemple, on peut citer les cryptates de terre rare  
10 (Europium, Terbium) décrits dans les brevets EP 180 492, EP 321 353, EP 601 113, ainsi que les chélates de terre rare.

Le composé fluorescent accepteur est un composé fluorescent qui après excitation par transfert d'énergie du composé donneur va émettre un signal fluorescent à une longueur d'onde donnée.

15           Il existe de nombreux composés accepteurs susceptibles d'être utilisés pour mettre en œuvre les procédés selon la présente invention, parmi lesquels : les allophycocyanines, l'allophycocyanine réticulée telle que la XL665 (CIS bio international), les cyanines telle que la Cy5, les rhodamines, les squaraines, les bodipys , les fluorescéines.

20           L'homme du métier est à même de sélectionner le composé fluorescent accepteur adéquat en fonction du composé fluorescent donneur choisi.

La méthode de détermination d'une activité enzymatique décrite ci-dessus endoglycosidase peut permettre d'étudier les effets de modulation de cette activité enzymatique exercés par des composés que l'on souhaite tester.

25           Par modulation d'une activité enzymatique, on entend une inhibition ou activation de cette activité enzymatique, quel qu'en soit le mécanisme.

L'invention concerne donc également une méthode de détection d'un composé susceptible de moduler une activité enzymatique de type endoglycosidase, comprenant les étapes suivantes :

- 30           i. mettre en contact un substrat susceptible d'être clivé par une endoglycosidase avec une endoglycosidase, en présence ou en l'absence du composé à tester,
- ii. mesurer l'évolution de la quantité du substrat intact, et

- iii. comparer l'évolution de la quantité de substrat mesuré en l'absence du produit à tester avec celle mesurée en présence du produit à tester.

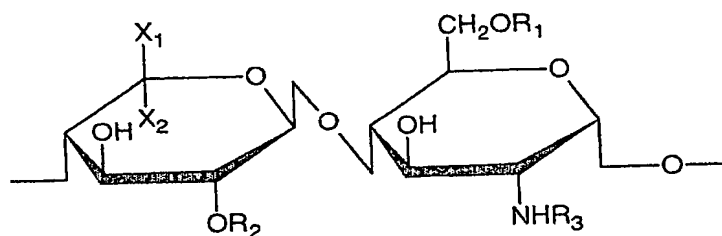
Dans cette méthode, le substrat est marqué de manière directe ou indirecte par un premier composé donneur et par un second composé accepteur, et en ce que la quantité de substrat intact est déterminée en mesurant un signal émis par le composé accepteur, ce signal résultant d'un transfert par effet de proximité entre le donneur et l'accepteur.

Dans cette dernière méthode, l'endoglycosidase utilisée peut être, notamment, une héparanase choisie parmi l'héparanase recombinante, l'héparanase purifiée, l'héparanase non-purifiée ou l'héparitinase.

Dans une mise en œuvre particulière de cette méthode, le premier composé donneur et le second composé accepteur sont des composés fluorescents, le transfert de proximité est un transfert d'énergie et le signal émis est un signal fluorescent.

Le substrat utilisé dans les méthodes précédentes peut être choisi parmi, les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) et leurs dérivés, les héparanes sulfates (HS) associés avec la matrice extracellulaire et leurs dérivés, l'héparine, les héparanes sulfates (HS) ou leurs dérivés et contiendra au moins un motif de

formule suivante :



dans laquelle,

$R_1$  et  $R_3$  sont choisis parmi les groupes : H,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,

$R_2$  est choisi parmi les groupes  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ,

$X_1$  et  $X_2$  représentent H,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COO}^-$ .

Les dérivés de substrat sont des HS ou des HSPG, ayant subi des modifications mineures, qui ne perturbent pas la reconnaissance enzyme-substrat. Plus précisément ces dérivés de substrat peuvent être clivés par une enzyme ayant une activité de type héparanase.

Les méthodes selon l'invention peuvent être mises en œuvre en utilisant différents formats. Les formats suivants sont les formats préférés et sont représentés sur la figure 1.

Format a : Le substrat peut être lié de manière covalente à un composé  
5 fluorescent donneur et à un composé fluorescent accepteur.

Format b : Le substrat est lié de manière covalente à un membre d'un  
premier couple ligand-récepteur et à un membre d'un second couple ligand-  
récepteur, le composé fluorescent donneur est lié de manière covalente à l'autre  
membre du premier couple ligand-récepteur et le composé fluorescent donneur est  
10 lié à l'autre membre du second couple ligand-récepteur.

Format c : Le substrat est lié de manière covalente au composé fluorescent  
donneur et est lié de manière covalente à un membre d'un couple ligand-récepteur,  
et le composé fluorescent accepteur est lié de manière covalente à l'autre membre  
dudit couple ligand-récepteur

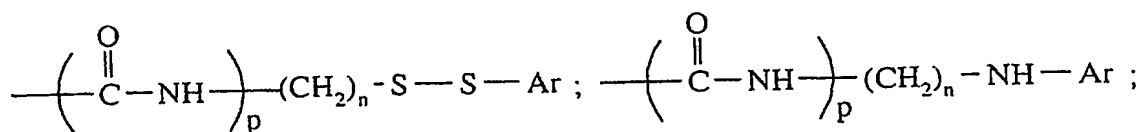
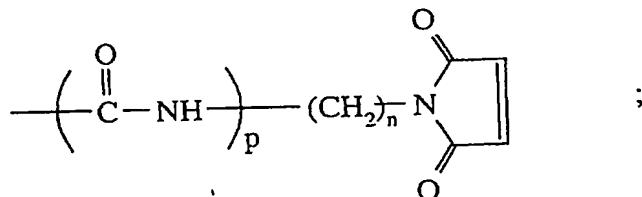
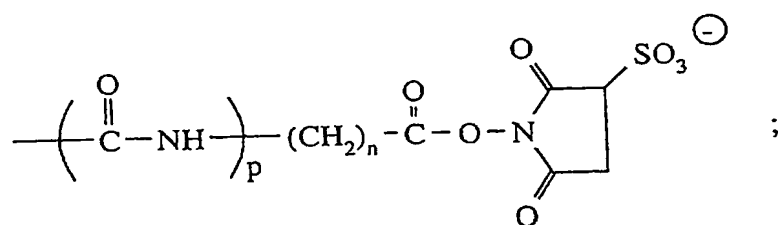
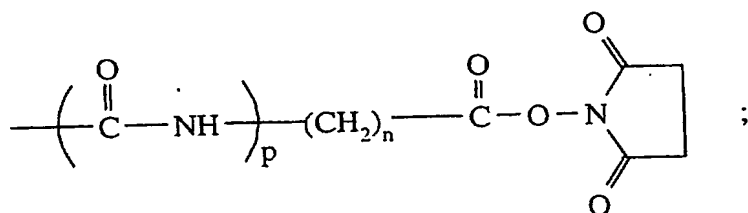
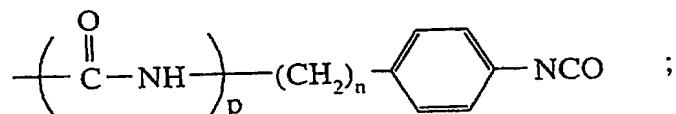
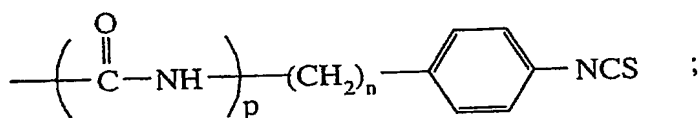
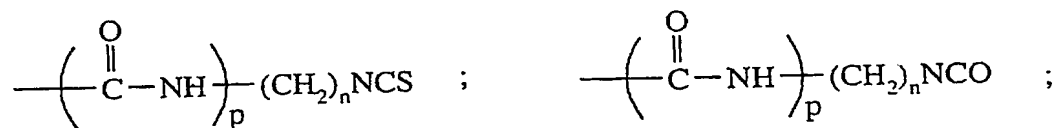
15 Format d : Le substrat est lié de manière covalente au composé fluorescent  
accepteur et est lié de manière covalente à un membre d'un couple ligand-  
récepteur, et en ce que le composé fluorescent donneur est lié de manière  
covalente à l'autre membre dudit couple ligand-récepteur.

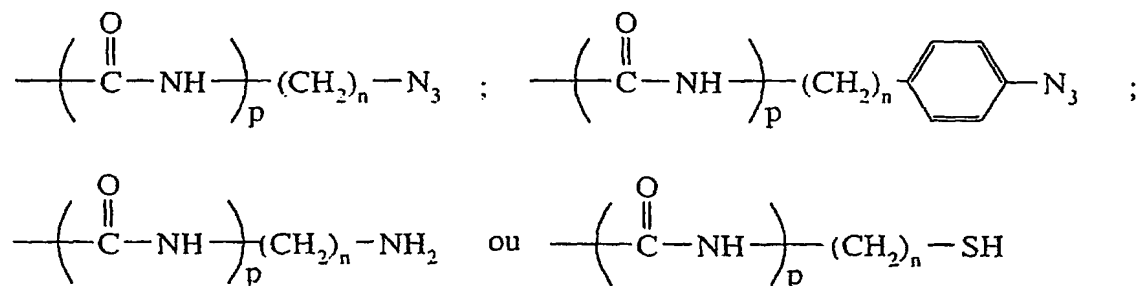
Le terme « couple ligand-récepteur » désigne deux partenaires de liaison  
20 tels que les couples : haptène/anticorps ; DNP/ anticorps anti-DNP, dans lequel  
DNP représente le dinitrophénol ; GST/anticorps anti-GST dans lequel GST  
représente la glutathione S-transférase ; biotine/avidine ; 6HIS/anticorps anti-6HIS  
dans lequel 6HIS est un peptide constitué de 6 histidines ; Cmyc/anticorps anti-  
Cmyc dans lequel Cmyc est un peptide constitué des acides aminés 410-419 de la  
25 protéine Cmyc humaine ; FLAG®/anticorps anti-FLAG ® dans lequel FLAG ® est un  
peptide de 4 acides aminés ; HA/anticorps anti HA dans lequel HA est un épitope de  
l'hémagglutinine d'Influenza, constitué de 9 acides aminés. D'autres couples peuvent  
être utilisés.

Ces systèmes dits « tag/antitag » sont bien connus de l'homme du métier et  
30 sont disponibles commercialement.

Le composé fluorescent donneur, le composé fluorescent accepteur, et les  
membres des premier et second couples ligands-récepteurs peuvent être liés de  
manière covalente au substrat en utilisant des groupes réactionnels tels que les  
groupements maléimide, acide carboxylique, haloacétamide, halogénure d'alkyle,

- 5 azido, hydrazido, aldéhyde, cétone, amino, sulfhydryl, isothiocyanate, isocyanate, monochlorotriazine, dichlorotriazine, aziridine, halogénure de sulfonyle, halogénure d'acide, hydroxysuccinimide ester, hydroxysulfosuccinimide ester, imido ester, hydrazide, azidonitrophényl, azidophényl, azide, 3-(2-pyridyl dithio)-propionamide, glyoxal et plus particulièrement les groupements de formule :





où n varie de 0 à 8 et p est égal à 0 ou 1, et Ar est un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons comprenant 1 à 3 hétéroatomes, éventuellement substitué par un atome d'halogène.

Ces groupes réactionnels sont introduits sur le composé fluorescent donneur, accepteur ou sur le membre d'un couple ligand-récepteur et sur le substrat en utilisant des fonctions NH<sub>2</sub>, COOH, CHO présentes sur ces molécules.

Si le substrat utilisé est un HS, il est possible de coupler les composés fluorescents ou des membres de couples ligand-récepteur via les fonctions amines ou carboxyles de l'HS. L'utilisation de ces groupements pour la fabrication de conjugués est traitée dans « Bioconjugate Techniques », G.T. Hermanson, Academic Press, 1996.

Les fonctions amines peuvent être utilisées pour la fixation du premier ou du second fluorophore, ou encore d'un membre d'un couple ligand-récepteur. A cet effet, les composés fluorescents ou les membres de couples ligands récepteurs sont couplés avec des groupements réactionnels permettant le couplage avec une amine de l'HS ou de l'HSPG. A titre d'exemple non limitatif, le premier ou second fluorophore, ainsi qu'un des membres de couples ligands/récepteurs peuvent être couplés à un groupement isothiocyanate, isocyanate, ester N-hydroxysuccinimide, azoture d'acyle, chlorure de sulfonyl, aldehydes, glyoxal, époxyde, époxirane, carbonate, halogénure d'aryle, Imidoesters, carbodiimides, anhydrides.

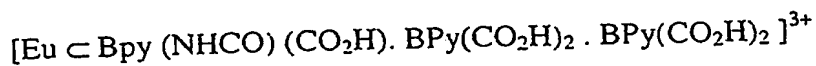
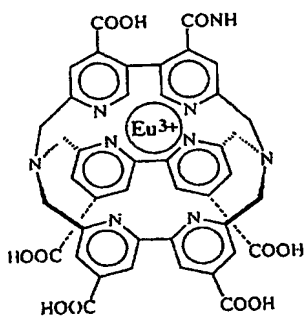
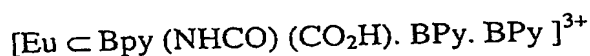
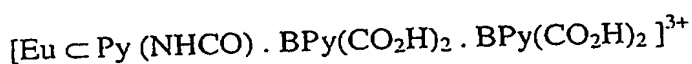
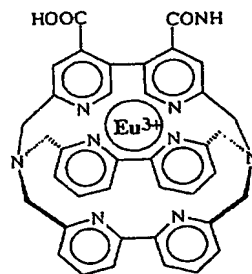
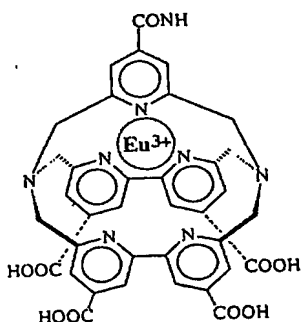
Si les fonctions carboxyles de l'HS sont utilisées, les composés fluorescents ou membres de couples ligand-récepteur peuvent être couplés à des groupes réagissant avec ces fonctions carboxyles, tels que les diazoalkanes, les diazoacetyls, les carbonyldiimidazole, les carbodiimides.

Si le substrat utilisé est un HSPG, il est possible de coupler les composés fluorescents ou des membres de couples ligand-récepteur via les fonctions CHO

(après oxydation des fonctions OH) des sucres de la partie glucidique (HS) ou les fonctions amines de la partie protéique (protéoglycane).

Dans les méthodes selon l'invention, le composé donneur est un cryptate ou un chélate de terre rare, et le composé fluorescent donneur est choisi parmi les rhodamines, les cyanines, les squaraines, les bodipys, les fluorescéines, l'allophycocyanine et leurs dérivés. Les dérivés de composés fluorescents accepteurs sont des molécules fluorescentes dont les propriétés spectroscopiques sont compatibles avec le transfert d'énergie.

Les cryptates de terre rare préférentiellement utilisés dans les procédés selon l'invention sont des cryptates d'Europium de formule :



La méthode de détection d'un composé susceptible de moduler une activité enzymatique de type héparanase permet de cribler des banques de produits qui



peuvent être notamment des anticorps anti-héparanase, des produits naturels, des produits de synthèse, des produits d'une librairie de composés obtenus par chimie combinatoire, des peptides, des protéines.

5 Les substrats susceptibles d'être utilisés par des procédés sont constitués de HS comportant des groupements biotine et DNP, caractérisés en ce que le rapport molaire final DNP/HS est compris entre 0,3 et 2 et de préférence est égal à 0,7, et en ce que le rapport molaire final Biotine/HS est compris entre 0,5 et 2 et de préférence est égal à 1.

10 D'autres substrats susceptibles d'être utilisés par des procédés sont constitués HSPG comportant des groupements biotine et DNP, caractérisés en ce que le rapport molaire final DNP/HSPG est compris entre 6 et 15 et de préférence est égal à 10,8, et en ce que le rapport molaire final Biotine/HSPG est compris entre 6 et 15, et de préférence est égal à 8.

15 Enfin, l'invention concerne également une trousse contenant les réactifs nécessaires à la mise en œuvre des méthodes selon l'invention et notamment les éléments suivants :

- un substrat susceptible d'être clivé par une enzyme ayant une activité de type héparanase,
  - un composé fluorescent donneur, lié de manière covalente ou susceptible
  - 20 de se lier de manière indirecte au dit substrat,
  - un composé accepteur lié de manière covalente ou susceptible de se lier de manière indirecte audit substrat,
- lesdits éléments pouvant se trouver dans le même flacon ou dans des flacons différents dans le cas où les composés fluorescents ne sont pas liés de manière
- 25 covalente au dit substrat.

La trousse selon l'invention contient de manière préférée :

- un héparane sulfate marqué à la biotine et au DNP
- un cryptate de terre rare couplé à un anticorps anti-DNP
- la XL665 couplé à la streptavidine

30 Une autre trousse selon l'invention contient :

- un héparane sulfate protéoglycane marqué à la biotine et au DNP
- un cryptate de terre rare couplé à un anticorps anti-DNP
- la XL665 couplé à la streptavidine

Les méthodes selon l'invention présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes de l'art antérieur, et notamment :

- 5       - elles sont très simples à mettre en œuvre puisqu'il suffit de mettre en présence les différents réactifs pour pouvoir obtenir un signal fluorescent caractéristique d'une activité enzymatique de type héparanase. Aucune étape de traitement chimique ou de séparation n'est nécessaire.
- 10       - Les volumes utilisés sont très faibles (20µl par puit) ce qui permet une miniaturisation du dosage, ainsi qu'une économie de réactifs. Moins de 30 ng de substrat est utilisé dans l'exemple 4, alors que dans la demande WO00/03036 par exemple, de 5 à 50 µg de substrat sont utilisés. Il en est de même de la quantité d'enzyme utilisée dans le dosage. Une miniaturisation plus importante est envisageable et simple à mettre en œuvre avec un lecteur approprié.
- 15       - Les temps d'incubation des réactifs sont courts : comme cela est montré dans l'exemple 4, une heure d'incubation suffit après la réaction enzymatique pour obtenir un signal. Les méthodes selon l'invention permettent donc de cribler rapidement des banques de molécules susceptible de moduler l'activité héparanase.

20       Les exemples suivants illustrent à titre non-limitatif les mises en œuvre préférées des méthodes selon l'invention :

#### **PARTIE EXPERIMENTALE**

Les abréviations suivantes sont utilisées :

- 25       DNP : dinitrophénol
- EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- HS : héparane sulfate
- NHS : N-hydroxysuccinimide

#### **A/ Utilisation d'un substrat de type héparane sulfate**

Dans ce cas, le substrat est fonctionnalisé en utilisant les fonctions COOH et NH<sub>2</sub> de l'HS.

**Exemple 1 : Préparation d'un substrat DNP-HS-Biotine****Réactifs utilisés :**

5 Solution d'HS à 20 mg/ml : 10mg HS + 0.5ml 10mM tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  pH7.0 0.15M NaCl.

Solution d'EDC à 20mM : 2.4mg EDC (PIERCE) + 0.625ml 0.1M tampon MES pH6.0.

Solution 5-(biotinamide)pentylamine 47mM : 4.2mg 5-(biotinamide) pentylamine (PIERCE) + 0.271ml 0.1M tampon MES pH6.0.

10 Solution DNP-NHS à 1mg/ml : 3mg DNP-NHS (CIS-Bio) + DMSO 1.0ml(Sigma D8418)

**Marquage à la biotine**

15 0,25 ml d'une solution d'HS à 20 mg/ml (Seikagaku) sont mélangés à 0,125 ml d'une solution de 5-(biotinamide)pentylamine à 47mM. Le mélange est incubé 18 h à température ambiante en présence de 0,125 ml d'une solution d'EDC à 20 mM. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 1,5 ml de tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  (10mM) NaCl (0,15M), pH 7. Le mélange est alors dialysé pendant 1,5 h à l'aide d'un système de dialyse Slide-A-Lyzer (Pierce) contre 600 ml de  
20 tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1 M, pH7. Deux dialyses supplémentaires effectuées pendant 3 h dans 600 ml de tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 10 mM pH 7 et pendant 16 h contre 600 ml de tampon borate à 50 nM, pH 8,3 permettent d'obtenir 2 ml de solution contenant l'HS biotinylé, ci-après Biotine-HS.

25 **Marquage au DNP**

La solution de 2 ml de Biotine-HS est mélangée avec 1 ml d'une solution de DNP-NHS à 3 mg/ml et incubée à température ambiante en présence d'1 ml de tampon borate à 50 mM, pH 8,3 et de 0,5 ml de DMSO pendant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite séparé par chromatographie sur une colonne  
30 de type Sephadex G25 SF (Pharmacia), éluée avec un tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1 M, pH 7. On obtient ainsi une solution de 8,83 ml d'héparane sulfate marquée par la biotine et le DNP, ci-après « DNP-HS-Biotine ».

**Exemple 2 : Détermination des rapports molaire finaux****Dosage du DNP-HS-Biotine :**

Un kit de dosage des HS (Byscan, Biocolor Ltd) permet de déterminer la  
5 concentration de DNP-HS-Biotine.

**Dosage du DNP :**

La concentration en DNP est déterminée en mesurant l'absorbance d'une  
solution de DNP-HS-Biotine à 360nm sur un spectrophotomètre ; la concentration  
10 en DNP est déterminée en comparant la valeur mesurée avec une courbe étalon.

**Dosage de la biotine :**

La concentration en biotine est mesurée à l'aide d'un dosage basé sur le  
phénomène de FRET : une première courbe est établie en mettant en présence des  
15 concentrations connues de biotine, un conjugué donneur cryptate-streptavidine, un  
conjugué accepteur XL-biotine et en mesurant le signal obtenu sur un fluorimètre  
Rubystar (BMG). Une courbe de déplacement est réalisée et servira de gamme  
étalon.

La même expérience est réalisée en remplaçant la biotine par le DNP-HS  
20 biotine à doser. La valeur du signal obtenu est reportée sur la gamme étalon qui  
permet de déterminer la concentration en biotine.

Les valeurs de Rmf obtenues sont :  $\text{DNP} / \text{HS} = 0,7$  et  $\text{Biotine} / \text{HS} = 1$

**Exemple 3 : Dosage du composé DNP-HS-Biotine par une méthode homogène  
25 de mesure de fluorescence en temps résolu (HTRF®).**

Le présent exemple permet de valider l'utilisation du produit DNP-HS-Biotine  
dans un dosage basé sur la mesure de fluorescence émise par transfert radiatif, en  
milieu homogène et en temps résolu.

**Réactifs utilisés :**

Conjugué streptavidine-XL solution à 10µg/ml : 3,2µl de SA-XL (CIS bio  
international) à 625µg/ml + 197µl de tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 ; 0,1%BSA  
0,4M KF.

Conjugué streptavidine-XL solution à 1µg/ml : 18µl de SA-XL (CIS bio international) à 20µg/ml + 162µl de tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 ; 0,1%BSA 0,4M KF.

5 Conjugué anticorps anti-DNP-Cryptate (ci-après aDNP-K) solution à 1µg/ml : 4,5µl de aDNP-K (CIS bio international) à 100µg/ml + 445µl de tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 0,1%BSA 0,4M KF.

Des solutions de DNP-HS-Biotine de concentration variable (de 22,2 à 5400 ng/ml) sont préparées à partir de la solution obtenue dans l'exemple 1, dans un tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  0,1M, pH 7.

10 Le dosage est effectué sur des microplaques multipuits. Chaque puits contient 5 µl de aDNP-K (1µg/ml), 5 µl de SA-XL (1µg/ml ou 10 µg/ml) et 10 µl de DNP-HS-Biotine de concentration variable. Les plaques sont analysées sur un spectrofluorimètre Rubystar (BMG) après incubation pendant 1 h à température ambiante (excitation 337nm, émission 620 et 665nm).

15 Les résultats obtenus sont exprimés sur la figure 2, qui montre l'évolution du signal en fonction de la concentration en DNP-HS-Biotine.

La figure 2 montre que, de manière surprenante, un signal est obtenu avec le substrat DNP-HS-Biotine, ce qui signifie qu'un transfert d'énergie a bien lieu entre le composé donneur (aDNP-K) et le composé accepteur (SA-XL). Le même type d'expérience réalisée en utilisant d'autres composés (SA-K et anticorps anti-HS-XL, pour doser un substrat Biotine-HS) n'a pas permis d'obtenir de signal, ce qui indiquait que le transfert d'énergie ne pouvait pas avoir lieu dans ce cas précis. Le signal obtenu en utilisant le présent format est en parfaite corrélation avec la concentration en DNP-HS-Biotine, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces produits pour mesurer une activité enzymatique de type héparanase.

20

25

#### **Exemple 4 : Dosage d'une activité de type héparanase**

##### **Réactifs utilisés :**

30 Solution d'héparitinase III (Sigma), de 0,2 à 20000 µunités/ml, en tampon  $\text{PO}_4$  20mM pH 7,2 ; NaCl 0,15M ; 0,1% BSA.

Solution SA-XL à 1 µg/ml : 1µl de SA-XL à 625 µg/ml (CIS bio international) + 624 µl de tampon  $\text{PO}_4$  0,1M pH 7,2 ; KF NaCl 0,4M ; 0,1% BSA.

Solution de aDNP-K à 0,8 µg/ml : 2 µl de aDNP-K à 100 µg/ml (CIS bio international) + 248 µl de tampon  $\text{PO}_4$  0,1M pH 7,2 ; KF NaCl 0,4M ; 0,1% BSA.

Solution de DNP-HS-Biotine à 1,2 µg/ml : 3,8 µl de DNP-HS-Biotine à 45 µg/ml + 140 µl de tampon PO<sub>4</sub> 20mM pH 7,2 ; NaCl 0,15M ; 0,1% BSA.

On effectue la réaction enzymatique en mélangeant 20 µl de DNP-HS-Biotine à 1,2 µg/ml avec 20 µl de solution d'héparitinase de concentration variable (de 0,2 à 20000 µunités/ml).

Ce mélange est laissé 5 h à température ambiante.

10 µl de chaque mélange réactionnel sont placés dans des puits de microplaques, dans lesquels on rajoute 5 µl/puits de aDNP-K (0,8 µg/ml) et 5 µl de SA-XL (1 µg/ml).

La lecture de la plaque est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante sur un spectrofluorimètre Rubystar (BMG).

Les résultats obtenus sont exprimés sur la figure 3 qui montre l'évolution du signal pour une concentration croissante d'enzyme.

La diminution du signal est en parfaite corrélation avec l'augmentation de l'activité enzymatique, c'est-à-dire le clivage du substrat DNP-HS-Biotine. Le format utilisé est donc parfaitement adapté à une méthode de dosage d'une enzyme de type héparanase, telle que l'héparitinase, mais également à une méthode de détermination d'un modulateur de cette activité enzymatique.

#### **Exemple 5 : Détermination d'un modulateur d'une activité enzymatique de type héparanase.**

On procède comme dans l'exemple 4 mais les différents mélanges réactionnels sont incubés avec des activités enzymatiques identiques, en présence ou en absence d'un produit à tester.

On détermine le pourcentage d'inhibition ou d'activation de l'enzyme due au composé à tester par comparaison des résultats obtenus en présence et en l'absence de produit à tester.

#### **B/ Utilisation d'un substrat de type héparane sulfate protéoglycane (HSPG)**

Dans ce cas, le substrat est fonctionnalisé en utilisant les fonctions OH de l'HS et les fonctions NH<sub>2</sub> de la partie protéique (protéoglycane).

**Exemple 6 : Synthèse du substrat DNP-Héparane Sulfate Protéoglycane-Biotine (ci-après DNP-HSPG-Biotine).**

Réactifs utilisés :

- 5 HSPG : Sigma, PM 200 kDa  
Biotine hydrazide : Pierce, PM 258,33 Da  
NaIO<sub>4</sub> : Sigma  
NaCNBH<sub>4</sub> : Sigma  
Le HSPG est dialysé contre une solution carbonate 100mM, pH 9.

10

Marquage au DNP

- On fait réagir une solution de HSPG et de DNP-NHS pendant 1 h à température ambiante. Les quantités utilisées sont telles que le rapport molaire initial est de 15 DNPs par HSPG. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur  
15 colonne Sephadex G-25 (NAP-5, Pharmacia) éluée par du tampon PO<sub>4</sub> 100 mM pH7. On obtient une solution de DNP-HSPG.

Marquage à la biotine

- La solution de DNP-HSPG obtenue précédemment est oxydée par une  
20 solution de NaIO<sub>4</sub> 10mM pendant 30 min à température ambiante. Après purification sur colonne Sephadex G25 éluée par du tampon P 100 mM pH 7,0, la solution de DNP-HSPG oxydée est mélangée avec une solution de biotine-hydrazide. Les quantités utilisées sont telles que le rapport molaire initial est de 10 biotine-hydrazides par DNP-HSPG. Le mélange réactionnel est incubé à 4°C  
25 pendant 16 h et est ensuite réduit par une solution de NaCNBH<sub>4</sub> 15 mM pendant 40 min à 4°C. Après purification sur colonne Sephadex G215 éluée par du tampon PO<sub>4</sub> 100mM pH 7,0, on obtient une solution de DNP-HSPG-Biotine.

- Exemple 7 : Dosage du composé DNP-HSPG-Biotine par une méthode**  
30 **homogène de mesure de fluorescence en temps résolu (HTRF®).**

Le présent exemple permet de valider l'utilisation du produit DNP-HSPG-Biotine dans un dosage basé sur la mesure de fluorescence émise par transfert radiatif, en milieu homogène et en temps résolu.

Réactifs utilisés :

Conjugué streptavidine-XL (ci-après Sa-XL) solution à 10 µg/ml préparée à partir de Sa-XL 625 µg/ml (CIS bio international) diluée dans tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 ; 0,2%BSA 0,8M KF.

5

Conjugué anticorps anti-DNP-Cryptate (ci-après aDNP-K) solution à 0,4 µg/ml préparée à partir de aDNP-K 100 µg/ml (CIS bio international) diluée dans tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 0,2%BSA 0,8M KF.

10 Conjugué streptavidine-Cryptate (ci-après Sa-K) solution à 0,8 µg/ml préparée à partir de Sa-K 200 µg/ml (CIS bio international) diluée dans tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 ; 0,2%BSA 0,8M KF

Conjugué anticorps anti-DNP-XL (ci-après aDNP-XL) solution à 4 µg/ml préparée à partir de aDNP-XL 250 µg/ml (CIS bio international) diluée dans tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  à 0,1M pH7,0 ; 0,2%BSA 0,8M KF.

15 Des solutions de DNP-HSPG-Biotine de concentration variable (de 10 à 5000 ng/ml) sont préparées à partir de la solution obtenue dans l'exemple 6, dans un tampon  $\text{PO}_4(\text{Na/K})$  0,1M, pH 7.

Le dosage est effectué sur des microplaques multipuits. Chaque puits contient 100 µl de DNP-HSPG-Biotine de concentration variable, 50 µl de Sa-XL et  
20 50 µl de aDNP-K ou 100 µl de DNP-HSPG-Biotine de concentration variable, 50 µl de Sa-K et 50 µl de aDNP-XL. Les plaques sont analysées sur un spectrofluorimètre Rubystar (BMG) après incubation pendant 1 h à température ambiante (excitation 337nm, émission 620 et 665nm).

25 Les résultats obtenus sont exprimés sur la figure 4, qui montre l'évolution du signal en fonction de la concentration en DNP-HSPG-Biotine.

La figure 4 montre qu'un signal est obtenu avec le substrat DNP-HSPG-Biotine, ce qui signifie qu'un transfert d'énergie a bien lieu entre le composé donneur (aDNP-K ou Sa-K) et le composé accepteur (SA-XL ou aDNP-XL). Les signaux obtenus en utilisant ces formats sont en parfaite corrélation avec la  
30 concentration en DNP-HS-Biotine, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces produits pour mesurer une activité enzymatique de type héparanase.



### Revendications

1. Méthode de détermination d'une activité enzymatique endoglycosidase dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- 5           i. mettre en contact un substrat susceptible d'être clivé par une endoglycosidase avec ledit échantillon, et
- ii. mesurer l'évolution de la quantité de substrat intact, une diminution de quantité de ce substrat étant représentative d'une activité endoglycosidase dans l'échantillon,
- 10 caractérisée en ce que le substrat est marqué de manière directe ou indirecte par un premier composé donneur et par un second composé accepteur, et en ce que la quantité de substrat intact est déterminée en mesurant un signal émis par le composé accepteur, ce signal résultant d'un transfert par effet de proximité entre le donneur et l'accepteur.

15

2. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que le premier composé donneur et le second composé accepteur sont des composés fluorescents, en ce que le transfert de proximité est un transfert d'énergie et en ce que le signal émis est un signal fluorescent.

20

3. Méthode de détection d'un composé susceptible de moduler une activité enzymatique endoglycosidase, comprenant les étapes suivantes :

- i. mettre en contact un substrat susceptible d'être clivé par une endoglycosidase avec une endoglycosidase, en présence ou en
- 25           l'absence du composé à tester,
- ii. mesurer l'évolution de la quantité du substrat intact, et
- iii. comparer l'évolution de la quantité de substrat mesuré en l'absence du produit à tester avec celle mesurée en présence du produit à tester,
- caractérisée en ce que le substrat est marqué de manière directe ou indirecte par
- 30 un premier composé donneur et par un second composé accepteur, et en ce que la quantité de substrat intact est déterminée en mesurant un signal émis par le composé accepteur, ce signal résultant d'un transfert par effet de proximité entre le donneur et l'accepteur.

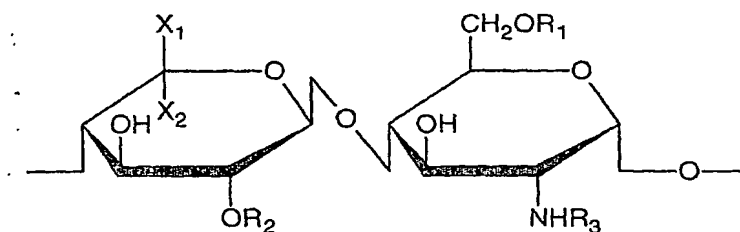
4. Méthode selon la revendication 3 caractérisée en ce que le premier composé donneur et le second composé accepteur sont des composés fluorescents, en ce que le transfert de proximité est un transfert d'énergie et en ce que le signal émis est un signal fluorescent.

5

5. Méthode selon les revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'endoglycosidase est une enzyme de type héparanase choisie parmi l'héparanase recombinante, l'héparanase purifiée, l'héparanase non purifiée et l'héparitinase.

10

6. Méthode selon les revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le substrat est choisi parmi les héparanes sulfates protéoglycanes et leurs dérivés, les héparanes sulfates associés avec la matrice extracellulaire et leurs dérivés, l'héparine, et les héparanes sulfates ou leurs dérivés, et contiendra de 1 à 30 motifs de formule :



15 dans laquelle,

$R_1$  et  $R_3$  sont choisis parmi les groupes : H,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}^-$ ,

$R_2$  est choisi parmi les groupes  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$

$X_1$  et  $X_2$  représentent H ou  $\text{COOH}$

20

7. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le substrat est lié de manière covalente à un composé fluorescent donneur et à un composé fluorescent accepteur.

25

8. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le substrat est lié de manière covalente à un membre d'un premier couple ligand-récepteur et à un membre d'un second couple ligand-récepteur, et en ce que le composé fluorescent donneur est lié de manière covalente à l'autre membre du premier couple ligand-récepteur et le composé fluorescent donneur est lié à l'autre membre du second couple ligand-récepteur.

9. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le substrat est lié de manière covalente au composé fluorescent donneur et est lié de manière covalente à un membre d'un couple ligand-récepteur, et en ce que le composé fluorescent accepteur est lié de manière covalente à l'autre membre dudit couple  
5 ligand-récepteur.

10. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le substrat est lié de manière covalente au composé fluorescent accepteur et est lié de manière covalente à un membre d'un couple ligand-récepteur, et en ce que le composé  
10 fluorescent donneur est lié de manière covalente à l'autre membre dudit couple ligand-récepteur

11. Méthode selon les revendications 8 à 11 caractérisée en ce que le premier et le second couple ligand-récepteur sont différents et choisis parmi les  
15 couples : haptène/anticorps, DNP/ anticorps anti-DNP, GST/anticorps anti-GST, biotine/avidine, 6HIS/anticorps anti-6HIS ; Cmyc/anticorps anti-Cmyc ; FLAG®/anticorps anti-FLAG ® ; HA/Anticorps anti-HA.

12. Méthode selon les revendications 1 à 11 caractérisée en ce que le  
20 composé donneur est un cryptate ou un chélate de terre rare, et en ce que le composé fluorescent accepteur est choisi parmi les rhodamines, les cyanines, les squaraines, les bodipys, les fluorescéines, l'allophycocyanine et leurs dérivés.

13. Méthode de détection d'un composé susceptible de moduler une activité  
25 enzymatique de type héparanase selon les revendication 3 et 4, caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi les anticorps anti-héparanase, les produits naturels, les produits de synthèse, les produits d'une librairie de composés obtenus par chimie combinatoire, des peptides, des protéines,

30 14. Composition susceptible d'être utilisée dans l'une des méthodes selon les revendications 1 à 13, comprenant une pluralité d'HS comportant ou non des groupements biotine et DNP, caractérisées en ce que le rapport molaire final DNP/HS est compris entre 0,3 et 2 et est de préférence égal à 0,7, et en ce que le

rapport molaire final Biotine/HS est compris entre 0,5 et 2 et de préférence est égal à 1.

15. Composition susceptible d'être utilisée dans l'une des méthodes selon les revendications 1 à 13, comprenant une pluralité d'HSPG comportant des groupements biotine et DNP, caractérisée en ce que le rapport molaire final DNP/HSPG est compris entre 6 et 15 et est de préférence égal à 10,8, et en ce que le rapport molaire final Biotine/HSPG est compris entre 6 et 15 et est de préférence égal à 8.

10

16. Trousse pour mettre en œuvre les méthodes selon les revendications 1 à 13, comprenant les éléments suivants :

- un substrat susceptible d'être clivé par une enzyme ayant une activité de type héparanase,
  - un composé fluorescent donneur, lié de manière covalente ou susceptible de se lier de manière indirecte audit substrat,
  - un composé accepteur lié de manière covalente ou susceptible de se lier de manière indirecte audit substrat,
- lesdits éléments pouvant se trouver dans le même flacon ou dans des flacons différents dans le cas où les composés fluorescents ne sont pas liés de manière covalente audit substrat.

15

20

17. Trousse selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle contient les éléments suivants :

- un héparane sulfate lié de manière covalente à la biotine et au DNP
- un cryptate de terre rare lié de manière covalente à un anticorps anti-DNP
- la XL665 liée de manière covalente à la streptavidine.

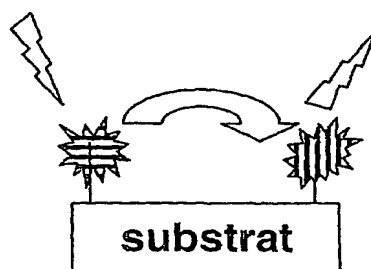
25

30

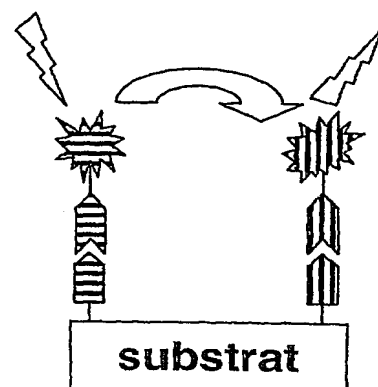
18. Trousse selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle contient les éléments suivants :

- un héparane sulfate protéoglycane marqué à la biotine et au DNP
- un cryptate de terre rare couplé à un anticorps anti-DNP
- la XL665 couplé à la streptavidine.

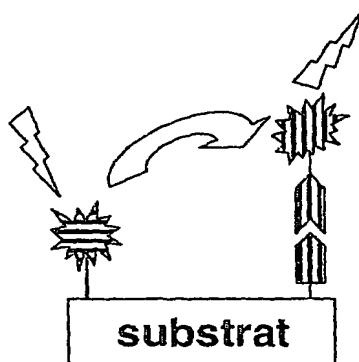
FIGURE 1



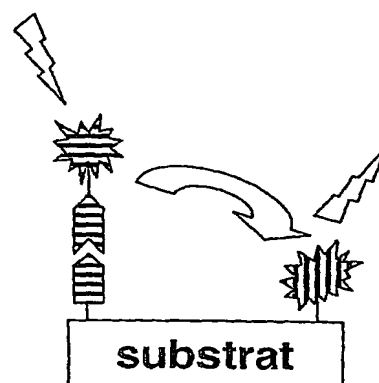
Format a



Format b



Format c



Format d



Composé fluorescent donneur



Composé fluorescent accepteur



Premier couple ligand-récepteur



Second couple ligand-récepteur

FIGURE 2

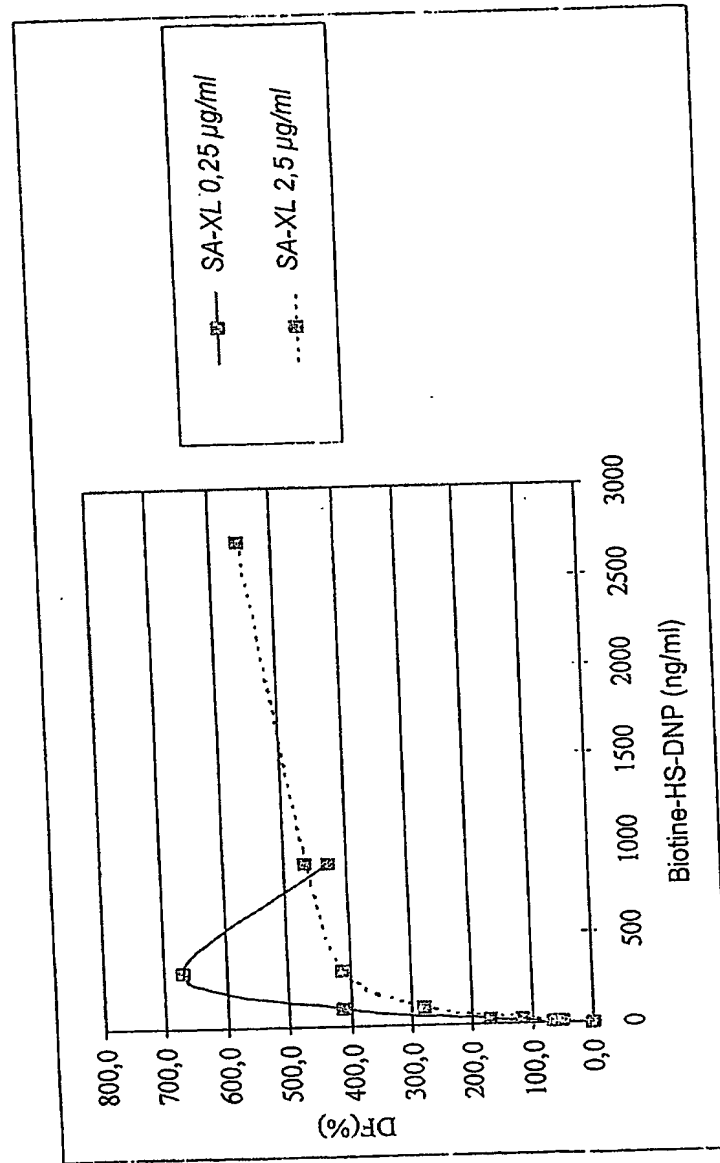


FIGURE 3

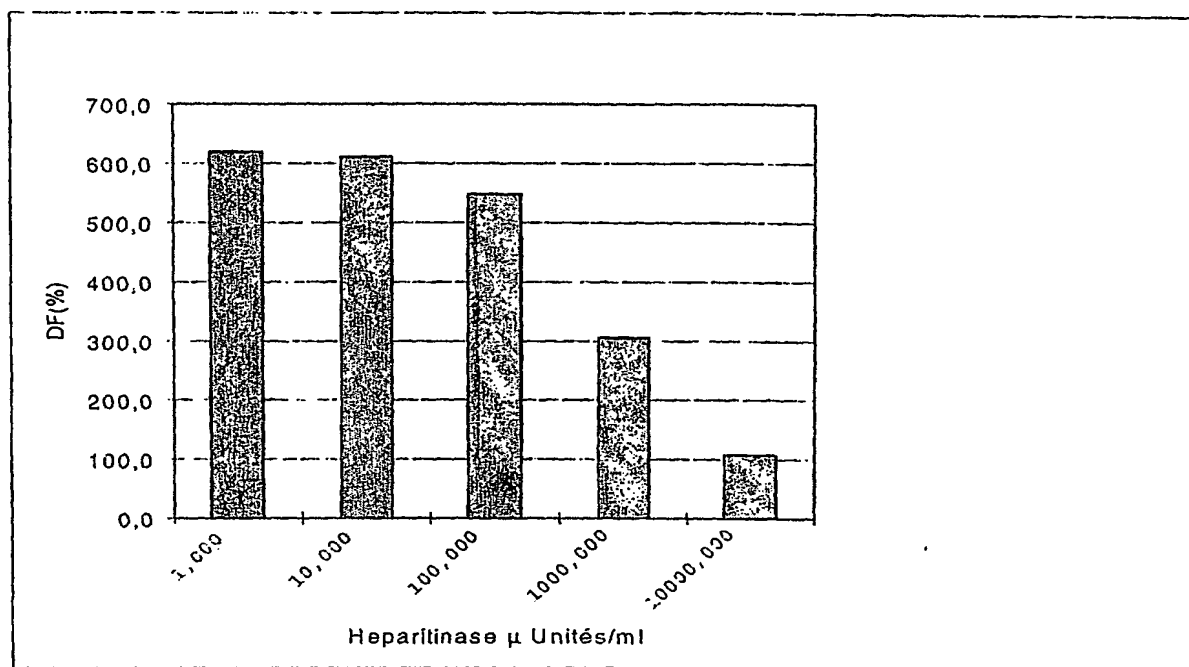
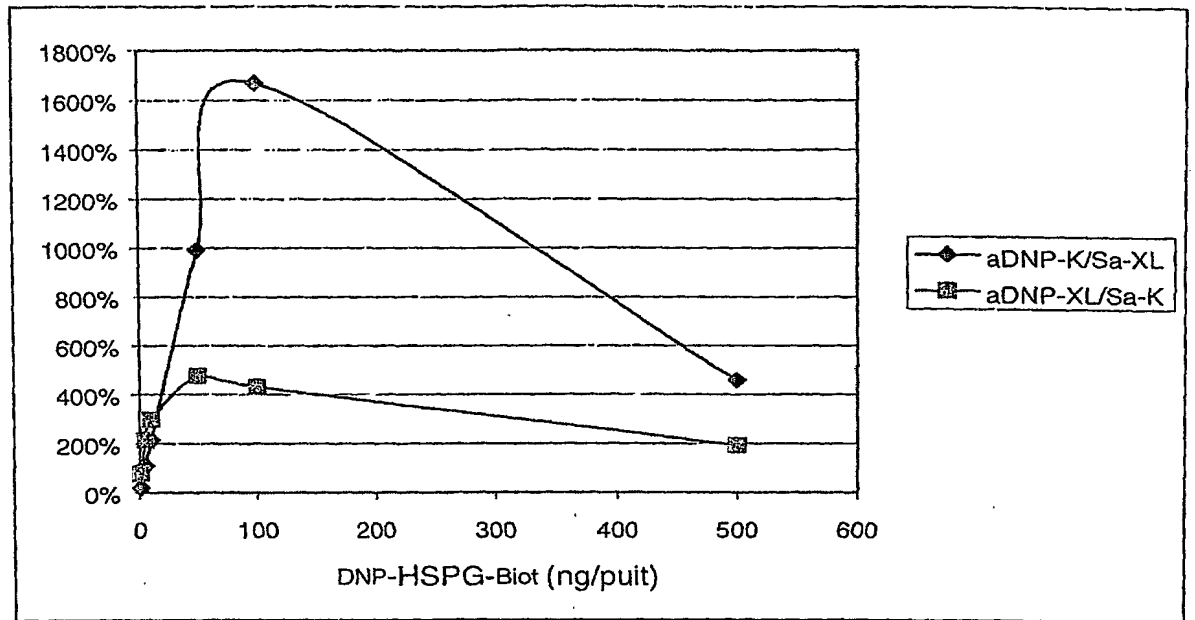


FIGURE 4







reçue le 21/11/02

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 112

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 M

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		1H189130 0020 FR BN MLG/NT	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02 09 836	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Méthode de détermination d'une activité enzymatique endoglycosidase.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> CIS BIO INTERNATIONAL RN 306 91400 SACLAY			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		PREAUDAT	
<b>Prénoms</b>		Marc, Olivier	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	Cidex 1200	
	<b>Code postal et ville</b>	30330	CONNAUX
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		TOKUDA	
<b>Prénoms</b>		Chikashi	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	3-76-13-703 Honda-cho, Midori-ku, Chiba-city	
	<b>Code postal et ville</b>		Chiba-prefecture (JAPON)
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		JACQUEMART	
<b>Prénoms</b>		Laurence	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	4, rue des Carmélites	
	<b>Code postal et ville</b>	30700	UZES
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le 21/11/2002 Marie-Louise GILLARD CPI N°92-1099			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**